

⑰ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 703 359

⑫ N° d'enregistrement national :

93 03732

⑬ Int Cl⁵ : C 08 G 73/06 , C 25 B 3/00 , 11/00 , C 12 Q 1/68

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 31.03.93.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL
(SOCIÉTÉ ANONYME) — FR.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 07.10.94 Bulletin 94/40.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

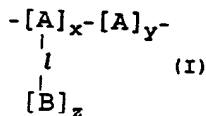
⑳ Inventeur(s) : Téoule Robert, Roget André, Livache
Thierry, Barthet Christelle et Bidan Gérard.

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : Cabinet Ores.

㉔ Copolymère nucléotide(s)/polymère conducteur électronique ; son procédé de préparation et son utilisation .

㉕ L'invention concerne un copolymère, caractérisé en ce
qu'il répond à la formule générale (I) suivante:



dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, et l représente une liaison covalente, ou un bras espaceur.

L'invention englobe également des procédés de préparation dudit polymère, ainsi que ses utilisations, en particulier pour la synthèse et le séquençage, et l'hybridation des acides nucléiques.

FR 2 703 359 - A1



COPOLYMERE NUCLEOTIDE(S)/POLYMERE CONDUCTEUR ELECTRONIQUE ; SON PROCEDE DE PREPARATION ET SON UTILISATION.

La présente invention est relative à la fixation d'acides nucléiques sur un polymère conducteur
5 électronique (PCE).

Dans un grand nombre de techniques couramment utilisées en biologie, par exemple la synthèse ou l'hybridation d'acides nucléiques, des oligonucléotides sont fixés de façon covalente par leur extrémité à un
10 support solide. Différents supports ont été utilisés dans ce but : le papier, le nylon, le verre, la silice, le polystyrène, le polyacrylamide, etc...

A l'heure actuelle, de nombreuses équipes cherchent à obtenir des supports portant un grand nombre
15 d'oligonucléotides de séquences différentes, disposées selon un arrangement préétabli, afin de réaliser simultanément différentes réactions (hybridation sur support par exemple.

C'est ainsi que, par exemple, cette approche a
20 été proposée pour faciliter le séquençage des acides nucléiques.

Des oligonucléotides différents disposés en rangées et colonnes sur des microsurfaces (matrices d'oligonucléotides sur support) ont été proposés pour
25 séquencer les acides nucléiques [LYSOV et al, Proc. USSR Acad. Sci., 303, 1508- 1511, (1988) ; KHRAPKO et al., FEBS Lett. 256, 118-122, (1989) ; KHRAPKO et al., DNA Séquence, vol 1, 375-388 (1991) ; BAINS & SMITH, J.Theor.Biol. 135, 303-307, (1988) ; CHURCH & KIEFFER-
30 HIGGINS, Science 240, 185-188 (1988) ; SOUTHERN, Demande PCT WO89/10977 (1989)]. La méthode est basée sur l'hybridation de chaînes d'ADN ou d'ARN cibles sur un ensemble d'oligonucléotides. Théoriquement, la présence ou l'absence d'une séquence dans l'acide nucléique cible
35 peut être déterminée par l'hybridation observée sur les micro-surfaces dans des conditions de stringence déterminées.

En ce qui concerne la synthèse *in situ* de polynucléotides ou de polypeptides, FODOR et al. [Science, 251, 767-773 (1991)], en combinant les méthodes de la synthèse chimique en phase solide, les groupements photolabiles et la photolithographie, ont réussi à synthétiser 1024 peptides sur une matrice de points (carrés de 100 μm de côté). Ces peptides ont été obtenus par synthèses simultanées et parallèles, en utilisant des masques de photolithographie et des groupements protecteurs photolabiles des synthons peptidiques. Un dinucléotide dCpT a été préparé *in situ*, en utilisant la thymidine protégée en 5' par un groupement protecteur photolabile (5'-nitrovératryl thymidine). La lumière était dirigée par un masque de photolithographie et un dépôt en damier de 100 μm de côté a été obtenu.

MASKOS & SOUTHERN (Nucleic Acids Res. 1992, 20, 1675-1678) ont réalisé, sous microscope, la synthèse *in situ* de quatre oligonucléotides différents sur une lame de verre.

Jusqu'à présent, les techniques utilisées pour le dépôt adressé d'oligonucléotides font appel, soit au dépôt manuel (qui n'est pas utilisable à l'échelon industriel), soit aux techniques de photolithographie, qui nécessitent l'utilisation de "masques" et en outre, sont difficilement applicables avec les acides nucléiques, qui sont photolabiles.

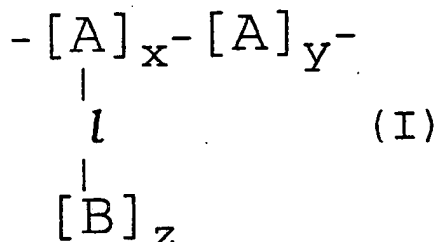
La présente Invention s'est fixé pour but l'obtention de nouveaux supports et de nouveaux procédés de fixation d'oligonucléotides, qui ne présentent pas les inconvénients des procédés proposés dans l'art antérieur.

Dans ce but, les Inventeurs ont eu l'idée d'utiliser comme support de fixation des polymères conducteurs électroniques.

Les Inventeurs sont maintenant parvenus à fixer par liaison covalente, et de façon stable, des nucléotides et des oligonucléotides sur un polymère

conducteur électronique, et à obtenir de la sorte de nouveaux copolymères.

La présente invention a pour objet un copolymère, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, et l représente une liaison covalente, ou un bras espaceur.

A titre d'exemple non limitatif de polymères conducteurs électroniques dont A représente un monomère on citera le polyacétylène, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrrène, le polypyrrole, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline, etc...

Avantageusement, A est une unité pyrrole.

Dans le cadre de l'exposé de la présente Invention, on entend par analogue de nucléotide, tout nucléotide modifié, tels que ceux décrits par exemple par UHLMANN, [Chemical Review, 90:4, 543-584 (1990)].

Lorsque l'unité B est un nucléotide, il peut s'agir non seulement d'un de ceux qui entrent habituellement dans la composition des oligonucléotides naturels, mais également leurs analogues ou dérivés utilisés en laboratoire.

Il peut s'agir par exemple :

* d'analogues de nucléotides entrant dans la composition d'oligonucléotides synthétiques ;

* de dérivés de nucléotides portant des fonctions protégées qui sont couramment utilisés pour la synthèse des acides nucléiques ; B_z peut dans ce cas constituer un intermédiaire de synthèse d'un
5 oligonucléotide.

B_z pourra aussi être un composé non naturel pouvant s'hybrider avec les acides nucléiques, tels que ceux décrits par UHLMANN (publication précitée).

Les unités B entrant dans la constitution de
10 B_z peuvent être identiques ou différents, et B_z peut constituer un homopolymère ou un hétéropolymère ; dans ce dernier cas, les unités B peuvent s'enchaîner selon une séquence quelconque, prédéterminée ou non.

Selon un mode de réalisation préféré de la
15 présente invention le rapport x/y est compris entre 1/5 et 1/100.000

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, l représente un bras espaceur répondant à l'une des formules suivantes :

20 $-R_1-[(CH_2)_n-R_2]_x-(CH_2)_m-R_3]_y-(CH_2)_p-$
dans laquelle :

- n est un nombre entier de 1 à 10 ;
- m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;
- p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;
- 25 -x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;
- y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;
- R₁, R₂ et R₃ qui peuvent être identiques ou différents représentent :

CH₂; O; S; NR'; CO; CH=CH ; NR'CO; CONR'; NHSO₂;



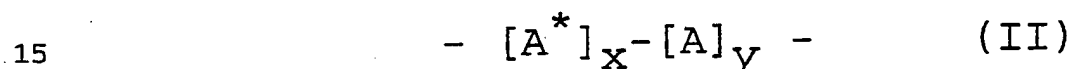
35 où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₁ à C₁₂.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polymère conducteur électronique comme support pour la fixation par liaison covalente, d'au moins un nucléotide.

5 La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I).

Selon une première variante, ce procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes
10 suivantes

- une première étape, au cours de laquelle on procède à la préparation d'un copolymère de formule générale (II) :



dans laquelle A, x et y sont tels que définis précédemment, et A* représente A fonctionnalisé.

- une deuxième étape au cours de laquelle on
20 procède à la fixation, sur le polymère de formule (II) d'au moins un groupe de formule générale (III) :



25 dans laquelle B et z sont tels que définis précédemment et l* est un bras activé capable de se lier à A*.

On entend par "fonctionnalisé" et "activé" au sens de la présente Invention, le résultat de toute modification chimique ayant pour but de pourvoir A et l de
30 fonctions chimiques capables de réagir entre elles pour former une liaison covalente.

Selon une autre variante, le procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) est

caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une étape a) au cours de laquelle on procède à la préparation du composé de formule générale (IV) :

5



10

dans lequel A, B, z, et l sont tels que définis ci-dessus,

- une étape b) au cours de laquelle on procède à la copolymérisation du composé (IV) avec le monomère A.

15

Avantageusement, au moins une étape de l'une ou l'autre des variantes du procédé conforme à l'invention fait intervenir au moins une réaction électrochimique. Cette copolymérisation électrochimique est avantageusement effectuée en surface d'une

20

électrode ; en fin de réaction on obtient de la sorte une électrode dont la surface est constituée par un copolymère conforme à l'invention.

Par exemple, pour la mise en oeuvre de la première variante du procédé conforme à l'invention, l'étape de préparation du copolymère de formule générale (II) et/ou l'étape de fixation du groupe de formule générale (III) peuvent être effectuées par réaction électrochimique ; dans la seconde variante, l'étape b) est avantageusement effectuée par copolymérisation

30

électrochimique du composé (IV) avec les monomères A.

La copolymérisation électrochimique est par exemple effectuée par voltampérométrie cyclique, en soumettant le mélange [(IV) : A] à des variations de potentiel électrique suffisantes pour provoquer la

35

polymérisation par une oxydation et une réduction successives ; le polymère formé étant conducteur, le

cycle oxydation-réduction peut être répété plusieurs fois.

Les méthodes de polymérisation électrochimique généralement utilisées pour la préparation des PCE, 5 telles que la polymérisation à courant (chronopotentiométrie) ou à potentiel (chronoampérométrie) imposés sont également applicables à la préparation des copolymères conformes à l'Invention.

La qualité du dépôt peut être contrôlée par le 10 choix des conditions expérimentales : le rapport oligonucléotide-pyrrole/pyrrole, la température du bain, la nature du solvant, la méthode électrochimique utilisée (voltampérométrie cyclique, chronoampérométrie, chronopotentiométrie). Le copolymère obtenu peut de la sorte pré- 15 senter des qualités de porosité et d'accessibilité différentes selon l'usage ultérieur souhaité, et la quantité d'oligonucléotide fixé peut être modulée.

Avantageusement, dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, les réactions 20 électrochimiques sont effectuées à la surface d'une électrode. L'électrode permet en effet de contrôler, par mesure du courant délivré au cours de la réaction, l'évolution de la réaction de polymérisation (par exemple l'épaisseur du polymère formé), ou de réactions 25 ultérieures effectuées sur le copolymère.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé conforme à l'invention dans l'une ou l'autre de ses variantes, il comprend en outre l'élongation de l'oligonucléotide B_2 , en plusieurs étapes successives, 30 chacune de ces étapes étant constituée par la fixation d'un ou plusieurs unités B.

L'élongation de l'oligonucléotide B_2 s'effectue à la surface du support par assemblage de monomères protégés, à partir d'au moins un nucléotide ou 35 oligonucléotide fixé en surface du polymère conducteur électronique.

Les méthodes classiques de synthèse par voie chimique des acides nucléiques sont utilisables dans la mise en oeuvre de ce mode de réalisation.

Les supports conformes à l'Invention permettent en outre de réaliser l'élongation de l'oligonucléotide par voie électrochimique, en utilisant des variations de potentiel de l'électrode pour effectuer les réactions de protection, de déprotection et de condensation de la chaîne polymérique en croissance.

La présente invention a également pour objet une électrode, caractérisée en ce que sa surface est constituée par un revêtement comprenant un copolymère de formule (I) conforme à l'Invention.

Une telle électrode peut être obtenue, par exemple, en déposant une couche d'un copolymère de formule (I) à la surface d'une électrode de platine, d'or, de chrome ou de titane recouvert d'or, ou de carbone vitreux, etc ...

Avantageusement, on peut associer plusieurs électrodes portant éventuellement des copolymères de nature différente. On obtient ainsi un dispositif utilisable pour la mise en oeuvre de réactions de synthèse, et/ou de réactions d'hybridation d'acides nucléiques.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux d'un dispositif conforme à l'Invention consiste à associer plusieurs électrodes dont deux au moins portent un groupe B_2 différent. Il peut s'agir par exemple d'un ensemble d'électrodes dont chacune porte un nucléotide (ou analogue) différent, ou d'un ensemble d'électrodes dont chacune porte un oligonucléotide de séquence différente.

Dans la mesure où il est possible de limiter les réactions électrochimiques aboutissant à la fixation de l'oligonucléotide à une très petite surface, un dispositif conforme à l'invention peut être constitué par une pluralité de microsurfaces de PCE portées par des micro-

électrodes distribuées sur un support (microchip PCE). De la sorte, des oligonucléotides B_z qui peuvent, si on le souhaite, être tous différents, peuvent être fixés de façon adressée et ordonnée sur ces microélectrodes.

5 Le "microchip PCE" est en particulier utilisable pour le séquençage des acides nucléiques et le diagnostic.

A titre d'exemple non limitatif illustrant ce qui précède, un copolymère [polypyrrole portant des
10 oligonucléotides/polypyrrole] conforme à la présente invention, peut être obtenu :

1) Par réaction chimique d'un nucléoside, d'un nucléotide, d'un oligonucléotide, ou d'un de leurs analogues sur un polypyrrole fonctionnalisé. Par exemple,
15 il est possible d'effectuer la condensation de l'aminoéthylpyrrole avec un oligonucléotide portant à une extrémité un phosphate libre ou un carboxyle activé.

2) Par copolymérisation chimique ou électrochimique du pyrrole avec le produit de condensation d'un
20 nucléoside, d'un nucléotide, d'un oligonucléotide, ou d'un de leurs analogues avec le pyrrole. Par exemple on peut procéder à la copolymérisation électrochimique du pyrrole avec un oligonucléotide ayant un bras espaceur portant un pyrrole à son extrémité. L'épaisseur de la
25 couche du copolymère obtenue sur une surface de platine à laquelle elle adhère fortement est de 0,1 μm à quelques μm , et elle peut être réalisée sur une surface de 100 μm^2 par exemple. Aucune réaction parasite de dégradation de l'oligonucléotide n'a pu être mise en évidence.

3) par préparation d'un polymère conducteur
30 électronique portant des fonctions chimiques protégées. Ces fonctions sont déprotégées localement et sélectivement pour permettre leur couplage avec un nucléoside, un nucléotide ou un oligonucléotide. Par exemple, il est
35 possible de réaliser la préparation de monométhoxytrityl aminoéthyl pyrrole/polypyrrole, et de le déprotéger loca-

lement soit en milieu acide, soit en appliquant un potentiel. La fonction amine libérée peut ensuite réagir avec un nucléoside, un nucléotide ou un oligonucléotide portant par exemple un phosphate ou un carboxyle activés.

- 5 4) par synthèse simultanée dirigée spatialement de différents oligonucléotides.

La synthèse d'un oligonucléotide s'effectue en un point du support par assemblage de nucléotides protégés, à partir d'un nucléoside accessible en surface
10 du copolymère. Les nucléotides protégés peuvent être des nucléosides phosphoramidites, des nucléosides phosphonates, des nucléosides phosphotriesters. Localement, la synthèse est effectuée à la manière dont est réalisée la synthèse d'un oligonucléotide sur support de silice dans
15 un synthétiseur. Mais la différence est que la synthèse de tout l'ensemble des oligonucléotides est réalisée simultanément, en réalisant électrochimiquement des opérations de déprotection ou de condensation sélectives sur une très petite surface, ce qui permet de masquer les
20 oligonucléotides qui ne doivent pas réagir. Ceci permet de réaliser en parallèle la synthèse de différents oligonucléotides.

Bien entendu, les procédés brièvement exposés ci dessus pour illustrer la synthèse de copolymères
25 [pyrrole/oligonucléotides-pyrrole] sont également applicables à des analogues polynucléotidiques, par exemple des analogues de la chaîne sucre-phosphate tels que mono- ou dithiophosphates, méthylphosphonates, phosphotriesters et des analogues non-ioniques non
30 phosphorylés tels que formacétals, carbamates, sulfoxydes.

Les copolymères conformes à l'invention présentent une bonne stabilité aux contraintes mécaniques, à l'humidité, à la dessiccation, à la chaleur,
35 aux bases, et sont donc compatibles avec un grand nombre

de réactions, ce qui autorise une large variété d'utilisations.

Les inventeurs ont procédé à l'hybridation sélective d'oligonucléotides à des oligonucléotides complémentaires fixés sur support de polypyrrole, et ont constaté que l'utilisation de ce support confère les avantages suivants :

- Le copolymère conforme à l'invention est poreux, ce qui confère aux oligonucléotides fixés sur le support une bonne accessibilité pour l'hybridation avec des acides nucléiques de séquence complémentaire. Cette accessibilité est mise en évidence par l'observation d'une hybridation proportionnelle à l'épaisseur de la couche de copolymère. Un oligonucléotide complémentaire se trouvant dans le milieu d'hybridation s'hybride trois fois plus sur une couche de copolymère pyrrole/oligonucléotide-pyrrole trois fois plus épaisse (et donc renfermant trois fois plus d'oligonucléotide lié au support). La cinétique d'hybridation est voisine de celle qu'on observe avec les supports d'hybridation conventionnels. Il faut noter que dans les mêmes conditions, un oligonucléotide de séquence non complémentaire ne se fixe pas sur le support.

- Les Inventeurs ont également vérifié que l'hybridation est réversible et que tout oligonucléotide hybridé peut être relargué par chauffage, ou par traitement avec de la soude diluée, sans dommage pour le polypyrrole et l'oligonucléotide fixé.

- Comme il a été indiqué précédemment, une copolymérisation adressée est réalisable sur des surfaces d'électrodes extrêmement petites. Ce qui permet de réaliser une matrice de points miniaturisée parfaitement ordonnée sur un support, chacun de ces points portant un oligonucléotide de nature parfaitement définie. Les chaînes nucléiques cibles portant une séquence complémentaire à la chaîne fixée sur le support s'hybrident sélectivement.

Il en résulte une densité locale d'acides nucléiques cibles extrêmement élevée, ce qui rend leur détection plus aisée, voire même dans certains cas supprime la nécessité d'une amplification préalable à la détection. La
5 détection de l'hybridation peut en particulier être faite par le biais de l'électrode qui a servi à préparer le copolymère, et qui peut servir ensuite pour la mesure des phénomènes d'association ou de dissociation qui se produiront à sa surface. L'hybridation d'un acide
10 nucléique complémentaire peut par exemple être suivie *in situ* par mesure électrique sur l'électrode qui supporte le polymère conducteur électronique, soit par mesure directe, soit en marquant l'oligonucléotide cible par une molécule électroactive telle qu'une phénothiazine ou une
15 quinone par exemple.

Il va de soi que les méthodes traditionnelles de détection des séquences cibles d'acides nucléiques sont également applicables.

Les inventeurs ont en outre réussi à synthétiser des oligonucléotides directement sur le copolymère conforme à l'Invention par déprotection électrochimique
20 *in situ*.

De manière générale, l'assemblage d'un nucléotide sur une chaîne polynucléotidique en croissance sur
25 un support fait appel à une série de réactions qui mettent en jeu des groupements protecteurs pour diriger la réaction sur une fonction donnée et l'empêcher sur une autre. Les Inventeurs ont mis cette propriété à profit pour orienter la réaction d'assemblage sur les surfaces
30 correspondant aux oligonucléotides choisis où l'on veut insérer un nucléotide.

Conformément à l'Invention, le groupement protecteur de la chaîne en croissance de l'oligonucléotide peut être éliminé localement par une
35 réaction électrochimique, ce qui permet d'ajouter un nucléotide à l'emplacement choisi.

Des avantages complémentaires découlent de cette possibilité d'effectuer, sur le support conforme à l'invention, une synthèse oligonucléotidique in situ. En effet, dans ce cas, il est possible de synthétiser in situ et en parallèle l'ensemble des oligonucléotides qui vont être disposés sur la matrice de points, au lieu de synthétiser indépendamment des oligonucléotides portant un bras pyrrole, puis d'effectuer des copolymérisations successives. Ceci permet d'envisager la réalisation industrielle de matrices de plusieurs milliers de microsurfaces.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et d'utilisation de copolymères conformes à l'invention.

PREPARATION D'UN SUPPORT POLYPYRROLE PAR COPOLYMERISATION DE PYRROLE ET D'UN OLIGONUCLEOTIDE PORTANT UN GROUPE PYRROLE ; PROPRIETES DE CE SUPPORT

EXEMPLE N° 1 : SYNTHÈSE DES OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES

Le schéma réactionnel global de cette synthèse est illustré à la figure 1.

- Préparation du composé n° 1

Ce composé peut être obtenu par réaction d'une diamine sur la diméthoxytrityl thiothymidine ou sur la diméthoxytrityl thiodésoxyuridine suivant les méthodes décrites par ROGET et al., [Nucleic Acids Res. 17, 7643-7651 (1989)].

- Préparation du composé n° 2

Le composé n° 1 (2 g ; 3,1 mmol) est séché par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre et redissous dans 20 ml de dichlorométhane. On ajoute 2 eq de dissuccinimidyl sébacoate (2,45 g ; 6,2 mmol). La réaction est laissée 3 heures à température ambiante. Le produit obtenu est séparé sur colonne de silice (gradient de 0 à 10% de méthanol dans le chloroforme) ou précipité dans l'hexane (R = 60%). Il peut aussi être utilisé tel

quel pour la synthèse du composé n° 3.

- Préparation du composé n° 3

Ce produit est préparé par ajout de l'aminoéthylpyrrole (1,36 g ; 12,4 mmoles) au mélange réactionnel précédent ou de 220 mg d'aminoéthyl pyrrole (2 mmoles) au composé n° 2 obtenu après purification. Le pH est amené à 8-8,5 par ajout d'une amine tertiaire (triéthylamine). La réaction est laissée 2 heures et on ajoute 250 ml de chloroforme. La solution organique obtenue est lavée par 2 fois 100 ml de NaHCO₃ 0,5 M, et 100 ml d'eau distillée, puis séchée sur sulfate de sodium. Le produit est séparé sur colonne de silice avec du méthanol dans le chloroforme (0 à 10%). Après évaporation du solvant, le composé n° 3 est repris par 10 ml d'éthanol et précipité dans 400 ml d'éther éthylique (R = 60%).

- Préparation du composé n° 4

Le composé n°3 (100 mg ; 0,11 mmoles) et du tétrazolate de diisopropylammonium (9 mg ; 0,5 eq) sont séchés par coévaporation dans un mélange de dichlorométhane (2 ml) et d'acétonitrile (3 ml) anhydres. Le résidu est repris par 2,5 ml de dichlorométhane stabilisé à l'amylène. De la bis-diisopropylaminocyanéthoxyphosphine (39 µl ; 1,2 eq) est ajoutée à travers un septum. Au bout de 2 heures de réaction, on ajoute 20 ml de dichlorométhane anhydre. La solution obtenue est lavée 2 fois par 25 ml de NaHCO₃ saturé puis 25 ml d'eau distillée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le phosphoramidite obtenu est repris par 2 ml de dichlorométhane, précipité dans 100 ml d'hexane et séché une nuit au dessiccateur. Le composé n°4 est obtenu avec un rendement de 85%. Il est conservé sous argon à -20°C à l'abri de l'humidité.

- Préparation du composé n° 5

Le composé n°4 (68 mg ; 0,06 mmoles) est redissous dans 300 µl d'acétonitrile anhydre (solution

0,2 M). Ce produit est utilisé pour préparer un oligonucléotide (Oligol-pyr) de séquence Pyr-TGT ACC TGA ATC GTC CGC CAT dans laquelle Pyr représente le dérivé de nucléotide correspondant au composé n°4. La préparation
5 de cet oligonucléotide est réalisée sur un synthétiseur automatique d'ADN (Applied Biosystems 381A) suivant les procédures décrites par le fabricant. Le composé n° 4 de l'invention est soumis au même cycle de synthèse que les phosphoramidites normaux (A C G T). Seuls la
10 concentration (0,2 M au lieu de 0,1 M) et le temps de réaction sont augmentés pour le composé n° 4.

Après synthèse, l'oligonucléotide-pyrrole est détritylé sur le support, par action de TCA (acide trichloracétique) à 3%. Il est coupé du support par 4 x
15 500 µl de NH₄OH à 28%. Le chauffage de cette solution pendant 16 heures à 60°C permet d'éliminer les groupements protecteurs. Le composé n°5 est obtenu par chromatographie en phase inverse en utilisant un gradient de 10 à 50% d'acétonitrile dans l'acétate de
20 triéthylammonium (25 mM, pH 7).

EXEMPLE 2 : PREPARATION DU SUPPORT PCE-POLYNUCLEOTIDE PAR COPOLYMERISATION ELECTRONIQUE (composé n° 6)

A - Principe de la technique

Les noyaux pyrroles oxydés sont capables de se
25 polymériser pour former un polymère insoluble, le polypyrrole. Une cellule d'électropolymérisation est représentée à la figure 2a.

Si l'oxydation est réalisée par voie électrochimique, la synthèse du polypyrrole n'aura lieu que sur
30 l'électrode de travail. Ceci permet donc une synthèse très localisée d'un polymère. Un oligonucléotide portant au bout d'un bras un noyau pyrrole peut donc être inséré dans le polymère simplement par copolymérisation des pyrroles. On obtient ainsi le polymère désiré
35 (composé 6).

Le polymère formé (polypyrrole) étant

conducteur, ces réactions peuvent être poursuivies et plusieurs cycles de synthèse peuvent être réalisés (il y a seulement une variation de résistance de l'électrode à chaque cycle).

5 B - Méthode

La polymérisation est conduite sur une électrode de platine de 60 mm^2 dans une solution contenant 10^{-2} M de pyrrole, $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ de pyrrole substitué, oligonucléotide porteur d'un groupe pyrrole en 5' (Oligol-pyr) et $0,1 \text{ M}$ de LiClO_4 (dopant).

10 L'oligonucléotide portant le pyrrole en 5' (composé n° 5, Oligol-pyr) a été synthétisé selon la méthode décrite ci-dessus au I, et purifié par HPLC sur phase inverse. Un oligonucléotide de même séquence
15 (Oligol) ne portant pas de pyrrole a servi de contrôle négatif.

Ces deux produits ont été marqués en 5' par du ^{32}P afin de suivre plus facilement les réactions de copolymérisation.

20 Les réactions d'oxydation du monomère et de réduction du polymère sont assurées par une variation cyclique du potentiel entre $-0,4$ et $+0,9 \text{ V/ECS}$ (voir figure 2b).

L'intégration du courant par rapport au temps
25 (quantité d'électrons consommée) permet une évaluation de la masse de polymère formé sur la surface de l'électrode et donc de l'épaisseur du film (de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$ pour $5 \cdot 10^{-2} \text{ C}$).

C - Résultats

30 * Etude de la stabilité d'un oligonucléotide dans les conditions d'électropolymérisation.

Le contrôle par HPLC de l'oligonucléotide en solution soumis à l'électropolymérisation ne montre aucune dégradation de celui-ci.

* Etude de la migration propre d'un oligonucléotide soumis à un potentiel.

Un acide nucléique est une molécule polyanionique capable de migrer dans un champ électrique mais, de par la présence des ions perchlorate dans le milieu, aucune migration n'est observée. D'autre part, aucune adsorption des oligonucléotides sur un polypyrrole préformé n'est mesurable.

10 * Etude de la spécificité et du taux d'incorporation des oligonucléotides lors de la copolymérisation.

1 - La polymérisation du pyrrole est conduite en présence de l'oligonucléotide O1 non modifié (TGT ACC TGA ATC GTC CGC CAT).

15 Oligo 1 : 10^{-9} M dans le milieu réactionnel

Oligo 1 sur support : 4.10^{-12} mol, soit 0,4% d'incorporation non spécifique.

2 - La polymérisation est conduite en présence de l'oligonucléotide modifié Oligo1-pyr (P TGT ACC TGA
20 ATC GTC CGC CAT)

Oligo1-pyr : 10^{-9} M dans le milieu réactionnel

Oligo1-pyr sur support : $7,2.10^{-12}$ mol, soit 0,72% d'incorporation.

44% des oligonucléotides-pyrroles détectés sur
25 le support sont effectivement fixés par le groupe pyrrole. Cependant, en ajoutant 0,2 M de thymidine 5' phosphate dans la solution d'électropolymérisation, la spécificité d'accrochage s'élève alors à 80% par diminution de la fixation de l'oligonucléotide non
30 modifié.

* Réactivité électrochimique de l'oligonucléotide -pyrrole.

La solution de départ contient 1 oligonucléotide-pyrrole pour 20 000 monomères pyrrole.
35 Par le calcul de la masse du polymère formé et par la quantité d'oligonucléotide fixé, on estime que le

polymère comprend 1 oligonucléotide-pyrrole pour 60 000 maillons pyrrole.

L'oligonucléotide-pyrrole s'incorpore donc 3 fois moins qu'un pyrrole libre, ce qui constitue un
5 taux d'incorporation tout-à-fait satisfaisant.

* Densité de fixation.

Dans les conditions expérimentales exposées ci-dessus, 5,3 pmoles/cm² d'oligonucléotides sont fixées.

La proportion d'oligonucléotide intégré dans
10 le polymère (1/60 000) peut être facilement améliorée par augmentation du rapport [oligonucléotide-pyrrole/pyrrole monomère] dans le milieu réactionnel. Ceci peut être réalisé de trois différentes façons

- Augmentation de la quantité d'oligonu-
15 cléotide ;

- Diminution de la concentration de pyrrole libre

- Diminution du volume réactionnel.

**EXEMPLE 3 : PROPRIETES DES COPOLYMERES OLIGONUCLEOTIDES-
20 POLYPYRROLE CONFORMES A L'INVENTION : UTILISATION COMME SUPPORT D'HYBRIDATION D'ACIDES NUCLEIQUES.**

Un support polypyrrole portant l'oligonucléotide Oligol a été synthétisé selon la méthode décrite précédemment. L'électropolymérisation a
25 été conduite jusqu'aux charges de 5.10^{-2} C pour obtenir un support de 0,2 μ m d'épaisseur, et de 15.10^{-2} C pour obtenir un support de 0,6 μ m d'épaisseur. Les réactions d'hybridation sont conduites dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,4, NaCl 300 mM, SDS 0,5%. Les lavages sont
30 réalisés dans le même tampon mais dilué 4 fois. Toutes ces réactions sont conduites à température ambiante.

Résultats

L'accessibilité des oligonucléotides greffés a été vérifiée par leur capacité d'hybridation vis-à-vis
35 d'un oligonucléotide complémentaire marqué au ³²P se trouvant dans le milieu liquide environnant.

a) Hybridation

La cinétique d'hybridation des supports de différentes épaisseurs est comparable, et la capacité totale d'hybridation est proportionnelle à l'épaisseur du support, comme le montre la figure 3, qui représente en abscisse le temps d'hybridation (en minutes), et en ordonnée la quantité d'oligonucléotide complémentaire marqué au ^{32}P fixé au support (en cpm), pour deux épaisseurs différentes : (●) = support de $0,2\ \mu\text{m}$ d'épaisseur ; (▲) = support de $0,6\ \mu\text{m}$ d'épaisseur.

b) Dénaturation

Il est possible de suivre la dénaturation des duplex de façon continue, ce qui montre la réversibilité du phénomène d'hybridation. Les figures 4a) et 4b) illustrent respectivement la quantité d'oligonucléotides restant sur l'électrode et la vitesse de dénaturation en fonction de la température de lavage (pour une variation de température de 1°C par minute) sur les supports d'épaisseur différente.

D'autre part, il a été vérifié que le support oligonucléotide-polypyrrole n'est pas affecté par des cycles de dénaturation/renaturation.

Dans les conditions expérimentales mises en oeuvre, la vitesse maximale de dénaturation est atteinte à 60°C environ, ce qui correspond au point de fusion théorique de l'oligonucléotide ($61,5^\circ\text{C}$).

EXEMPLE N° 4 : SYNTHÈSE IN SITU D'OLIGONUCLEOTIDES SUR SUPPORT POLYPYRROLE

BRAS CLIVABLE

Le schéma réactionnel est illustré à la figure 5.

Le support (composé n°8) est réalisé par électropolymérisation d'une solution de pyrrole et d'aminoéthylpyrrole ($10^{-2}\ \text{M}/10^{-3}\ \text{M}$) en présence de LiClO_4 $0,1\ \text{M}$ dans l'acétonitrile. L'électropolymérisation se

fait par balayage de -0,3 V à +0,85 V par rapport à Ag/Ag+ 10^{-2} M sur une électrode de platine de 60 mm².

- Préparation du composé n° 11

Le composé n°8 est lavé par de l'acétonitrile anhydre (2 x 5 ml) puis par de la triéthylamine dans l'acétonitrile (500 µl / 5 ml).

Le nucléoside activé (10 mg) est séché par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre, repris par 500 µl d'acétonitrile anhydre et ajouté au support dans un flacon hermétiquement bouché. L'ensemble est placé sous agitation mécanique douce pendant 24 heures. Le support est retiré et lavé par de l'acétonitrile puis du dichlorométhane jusqu'à disparition de la couleur du trityle dans les solvants de lavage.

Les fonctions amine du support n'ayant pas réagi avec le nucléoside doivent être bloquées. Ceci a été effectué par "capping" par un mélange d'anhydride acétique-N-méthylimidazole dans la pyridine. La réaction est laissée 6 heures. Le support fonctionnalisé (composé n° 11) est ensuite lavé intensivement par 3 x 10ml de pyridine, 3 x 10ml d'acétonitrile et 3 x 10ml de dichlorométhane successivement.

- Préparation du composé n° 12

- Le trimère d(CCT) a été préparé sur électrode de platine recouverte de polypyrrole par deux méthodes :

. Synthèse chimique totale suivant le cycle habituel de la synthèse phosphoramidite

. Synthèse avec détritylation électrochimique.

30 a) **Synthèse chimique totale**

On effectue, autant de fois que nécessaire, les étapes suivantes, chacune correspondant à la fixation d'un nucléotide ; ces étapes sont représentées à la figure 6 :

35 - Détritylation du support par 4 x 500 µl d'acide trichloroacétique à 2% dans le dichlorométhane ;

- Rinçage par de l'acétonitrile pour enlever le réactif (5 x 1 ml) ;
- Lavage par de l'acétonitrile anhydre pour synthèse d'ADN (3 x 1 ml) ;
- 5 - Ajout de 250 µl de phosphoramidite 0,1 M et 250 µl de tétrazole 0,5 M ;
- Couplage (2 mn) et élimination de la solution nucléosidique ;
- Rinçage par de l'acétonitrile (5 x 1 ml) ;
- 10 - Capping anhydride acétique/méthylimidazole (500 µl, 1mn) ;
- Rinçage par de l'acétonitrile (2 x 1 ml) ;
- Oxydation par iode/lutidine 1 mn (500 µl, 1 mn) ;
- Rinçage par 5 x 1 ml d'acétonitrile ;
- 15 - Détritylation, et début d'un nouveau cycle, etc ...

La mesure des trityles donne respectivement à l'issue chaque cycle : 0,090 DO/2 ml (dT), 0,095 DO/2 ml (dCT) et 0,087 DO/2 ml (dCCT).

20 **b) Synthèse avec déprotection électrochimique**

Les étapes de synthèse sont les mêmes que pour la synthèse chimique ci-dessus, mais la détritylation est réalisée par application d'un potentiel de 1,2 V pendant 5 mn.

- 25 La détritylation n'est pas quantifiable, car le cation trityle formé est capté par l'anode ce qui le soustrait à la mesure. Le cycle de couplage a cependant été réalisé.

- Préparation du composé n° 13

- 30 La coupure du support et l'élimination des groupements protecteurs sont faites par 2 ml d'ammoniaque dans un tube en verre fermé par un bouchon à vis la réaction est effectuée pendant 48 heures à température ambiante.

- 35 Les témoins préparés sur colonne de silice sont déprotégés par 4 x 250 µl d'ammoniaque pour les

décrocher du support ($t = 4 \times 1/2$ h). La solution ammoniacale est ensuite laissée 48 heures à température ambiante. Les solutions sont évaporées et analysées par chromatographie en phase inverse sur une colonne C4, 5 μ m de 25 cm. On applique un gradient de 0 à 30% de B (Acétate de triéthylammonium 25 mM, pH 7 et acétonitrile 50%) dans A (Acétate de triéthylammonium 25 mM, pH 7) en 30 min.

Le schéma réactionnel est illustré à la figure 7.

- Préparation du composé n° 14

Le polypyrrole aminé (composé n° 8) est lavé par de l'acétonitrile anhydre (2 x 5 ml) puis par de la triéthylamine dans l'acétonitrile (500 μ l/5 ml). Le nucléoside activé (composé n° 2) (20 mg) est séché par coévaporation dans l'acétonitrile anhydre, repris par 1 ml d'acétonitrile anhydre et ajouté au support (composé n° 8) dans un flacon hermétiquement bouché. L'ensemble est placé sous agitation mécanique douce pendant 24 heures. Le support greffé (composé n° 14) est lavé par de l'acétonitrile puis du dichlorométhane jusqu'à disparition de la couleur du trityle dans les solvants de lavage lors de leur acidification.

- Préparation du composé n° 15

Les fonctions alcool secondaire apportées par le nucléoside ainsi que les fonctions amine du support n'ayant pas réagi doivent être masquées. Pour cela, on réalise un blocage par un mélange d'anhydride acétique/N-méthylimidazole dans la pyridine (1 ml) pendant 6 heures. Un lavage par de la pyridine (2 x 5 ml), de l'acétonitrile (2 x 5 ml) et du dichlorométhane (2 x 5 ml) permet d'obtenir le composé n° 15.

- Préparation du composé n° 16

Le composé n° 16 est synthétisé suivant le même protocole que le composé n° 12 avec des résultats semblables pour la détritylation. Ceci montre que la

nature du bras espaceur influe peu sur la synthèse chimique.

- Préparation du composé n° 17

Le composé n° 16 est déprotégé 48 heures à 5 température ambiante dans l'ammoniaque à 28% dans un flacon hermétiquement bouché. Le groupement diméthoxytrityle est ensuite coupé par l'acide trichloroacétique à 3% (3 x 3 ml) et mesuré pour vérifier que l'oligonucléotide est toujours sur le support.

10 **EXEMPLE N° 5 : COPOLYMERISATION D'OLIGONUCLEOTIDES-PYRROLE SUR DES MICROELECTRODES**

Une matrice de quatre électrodes est réalisée par inclusion de quatre fils de platine (diamètre 0,6 mm) dans un cylindre de verre (diamètre 5 mm x 10 mm de 15 hauteur). Une des électrodes est utilisée comme contre-électrode (voir fig. 8a). Ce système de matrice permet d'une part de réduire les volumes réactionnels (300 µl) et d'autre part de fixer des oligonucléotides différents sur chaque points de la matrice.

20 Les 3 électrodes sont successivement électrochimiquement recouvertes par un copolymère composé de pyrrole et d'oligonucléotides capable de détecter par hybridation une mutation du codon 61 du gène ras H humain. Ces 3 oligonucléotides portant en 5' un groupe 25 pyrrole sont les suivants :

- oligo normal : 5' Pyr TCCTCCTGGCCGG 3'
- oligo muté A : 5' Pyr TCCTCCAGGCCGG 3'
- oligo muté C : 5' Pyr TCCTCCCGGCCGG 3'

Chaque oligonucléotide est copolymérisé 30 successivement sur chaque électrode dans les conditions décrites dans l'exemple 1 mais dans un volume réactionnel de 300 µl au lieu de 3 ml.

Les copolymérisations sont réalisées de la même façon que celles décrites dans l'exemple 1 (volume 35 réactionnel de 300 µl au lieu de 3 ml). Les voltampérogrammes obtenus sont très réguliers et très reproduc-

tibles aussi bien à charge réduite ($2 \cdot 10^{-4}$ C) qu'à forte charge (10^{-3} C) (figure 8b). Dans ces conditions, $6 \cdot 10^{-14}$ moles d'oligonucléotide sont fixées sur $0,3 \text{ mm}^2$ (soit 18 pmoles/cm²) pour une épaisseur de film de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ (charge de 10^{-4} C).

- Détection d'une mutation ponctuelle d'un acide nucléique par hybridation sur une matrice 3 points.

Trois fragments d'acides nucléiques d'une longueur de 51 nucléotides sont utilisés afin de simuler les mutations ras H naturelles recherchées.

Ces trois acides nucléiques ont pour séquence :

- ras H normal :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCAGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

- ras H muté T :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCTGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

- ras H muté G :

5' CTGTTGGACATCCTGGATGCCGGCCGGGAGGAGTACAGCGCCATGCGCGAC 3'

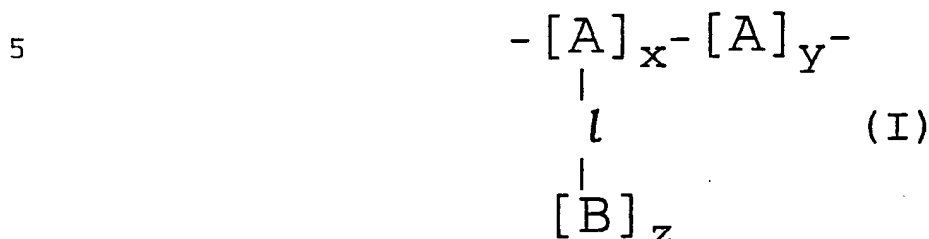
Ils sont spécifiquement reconnus par hybridation avec les sondes fixées sur la matrice ; respectivement oligo normal, oligo muté A, oligo muté C.

La réaction d'hybridation est réalisée à 25°C durant 1 heure, dans un tampon phosphate 20 mM, pH 7,4, NaCl 300 mM, SDS 0,5% contenant 0,1 pmole d'acide nucléique à détecter marqué en 5' par du ³²P. La matrice est ensuite lavée dans le même tampon à 35°C. La détection est réalisée par autoradiographie de la matrice sur un film photo. Dans ces conditions, l'hybridation de l'acide nucléique cible n'a lieu que sur l'électrode portant l'oligonucléotide d'une séquence strictement complémentaire ; aucune hybridation croisée n'est visible.

La détection spécifique d'une mutation ponctuelle est donc possible grâce à cette matrice en 3 points.

REVENDICATIONS

1) Copolymère, caractérisé en ce qu'il répond à la formule générale (I) suivante :



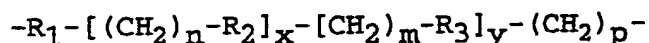
10 dans laquelle l'unité A représente un monomère d'un polymère conducteur électronique, l'unité B représente un nucléotide, un oligonucléotide ou un de leurs analogues, x, y et z représentent des nombres entiers égaux ou supérieurs à 1, ou y peut être égal à 0, 15 et l représente une liaison covalente, ou un bras espaceur.

2) Copolymère selon la revendication 1, caractérisé en ce que A représente une unité monomère d'un PCE choisi dans le groupe comprenant le 20 polyacétyle, la polyazine, le poly(p-phénylène), le poly(p-phénylène vinylène), le polypyrrène, le polypyrrrole, le polythiophène, le polyfuranne, le polysélénophène, la polypyridazine, le polycarbazole, la polyaniline.

25 3) Copolymère selon la revendication 2, caractérisé en ce que A est une unité pyrrole.

4) Copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le rapport x/y est compris entre 1/5 et 1/100.000

30 5) Copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l représente un bras espaceur répondant à la formule suivante :



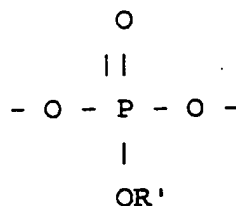
dans laquelle :

35 -n est un nombre entier de 1 à 10 ;

-m est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;

-p est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 10 ;
 -x est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;
 -y est égal à 0 ou est un nombre entier de 1 à 8 ;
 -R₁, R₂ et R₃ qui peuvent être identiques ou différents
 5 représentent :

CH₂; O; S; NR'; CO; CH=CH ; NR'CO; CONR'; NHSO₂;



10

où R' représente un atome d'hydrogène ou une chaîne alkyle en C₁ à C₁₂.

6) Procédé de préparation d'un copolymère de
 15 formule générale (I) selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une première étape, au cours de laquelle on procède à la préparation d'un copolymère de formule
 20 générale (II) :



dans laquelle A, x et y sont tels que définis
 25 dans la revendication 1, et A* représente A fonctionnalisé.

- une deuxième étape au cours de laquelle on procède à la fixation, sur le polymère de formule (II) d'au moins un groupe de formule générale (III) :

30

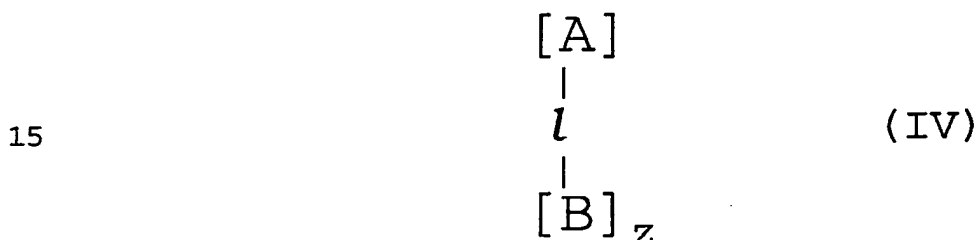


dans laquelle B et z sont tels que définis précédemment et l* est un bras activé capable de se lier à
 35 A*.

7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'étape de préparation du copolymère de formule générale (II) et/ou l'étape de fixation du groupe de formule générale (III) sont effectuées par réaction électrochimique.

8) Procédé de préparation d'un copolymère de formule générale (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- une étape a) au cours de laquelle on procède à la préparation du composé de formule générale (IV) :



dans lequel A, B, z, et l sont tels que définis ci-dessus,

- une étape b) au cours de laquelle on procède à la copolymérisation du composé (IV) avec le monomère A.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'étape b), est effectuée par copolymérisation électrochimique du composé (IV) avec les monomères A.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce que l'on procède en outre à l'élongation de B_z , en plusieurs étapes successives, chacune de ces étapes étant constituée par la fixation d'un ou plusieurs unités B.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'élongation de B_z fait intervenir une suite de réactions électrochimiques.

12) Procédé selon une quelconque des revendications 7, 9 ou 11, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre à la surface d'une électrode.

13) Utilisation d'un polymère conducteur électronique comme support pour la fixation par liaison covalente, d'au moins un nucléotide, ou d'au moins un oligonucléotide.

5 14) Utilisation d'un copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme support de synthèse polynucléotidique.

10 15) Utilisation d'un copolymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 comme support d'hybridation d'acides nucléiques.

16) Electrode, caractérisée en ce que sa surface est constituée par un revêtement comprenant un copolymère de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

15 17) Dispositif utilisable pour des réactions de synthèse et d'hybridation d'acides nucléiques, caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs électrodes selon la revendication 16, lesquelles électrodes peuvent être identiques ou différentes.

20 18) Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend plusieurs électrodes, dont au moins deux portent chacune un groupe Bz différent.

FIGURE 1

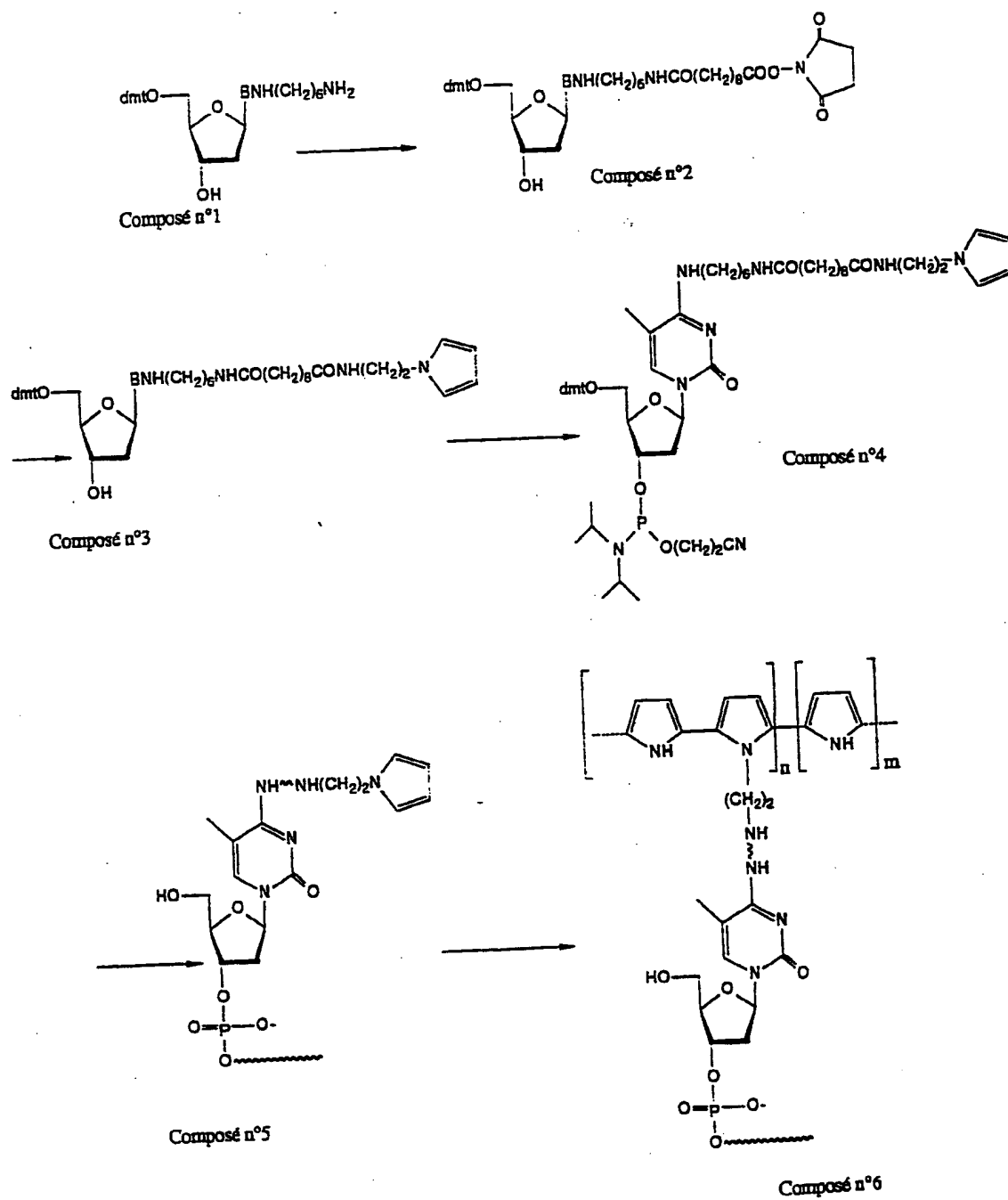
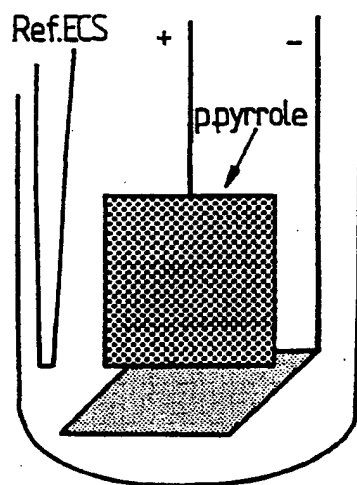
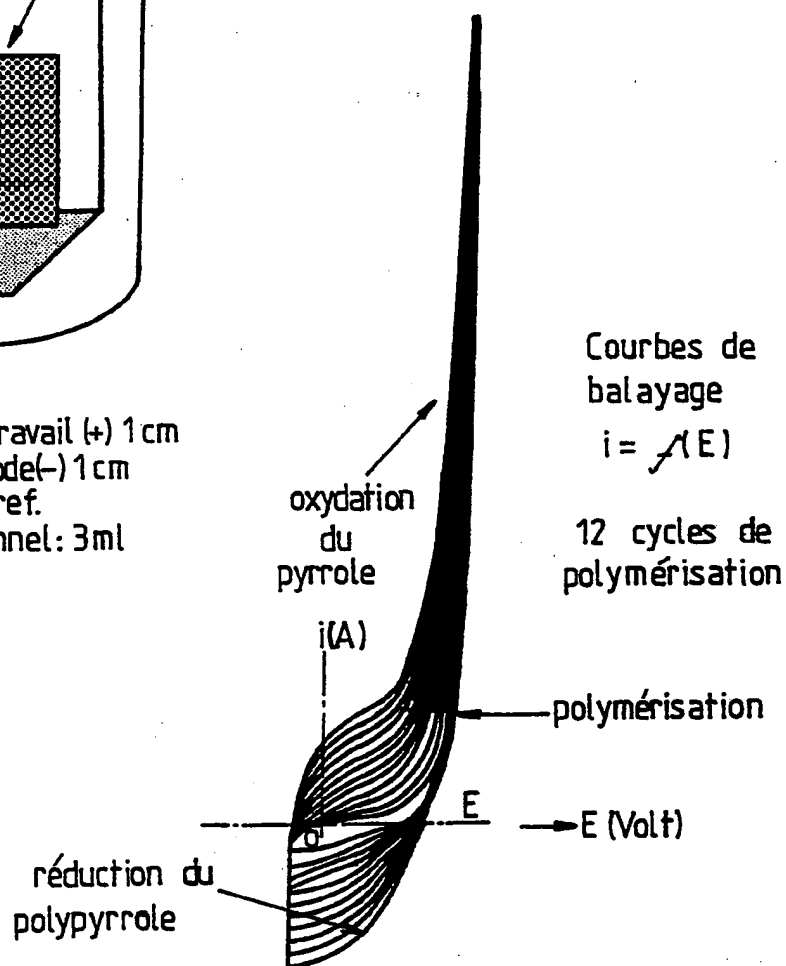


FIGURE 2

2a Cellule d'électropolymérisation



1 électrode de travail (+) 1 cm
 1 contre-électrode (-) 1 cm
 1 électrode de ref.
 Volume réactionnel: 3 ml



2b Voltampérométrie cyclique

FIGURE 3

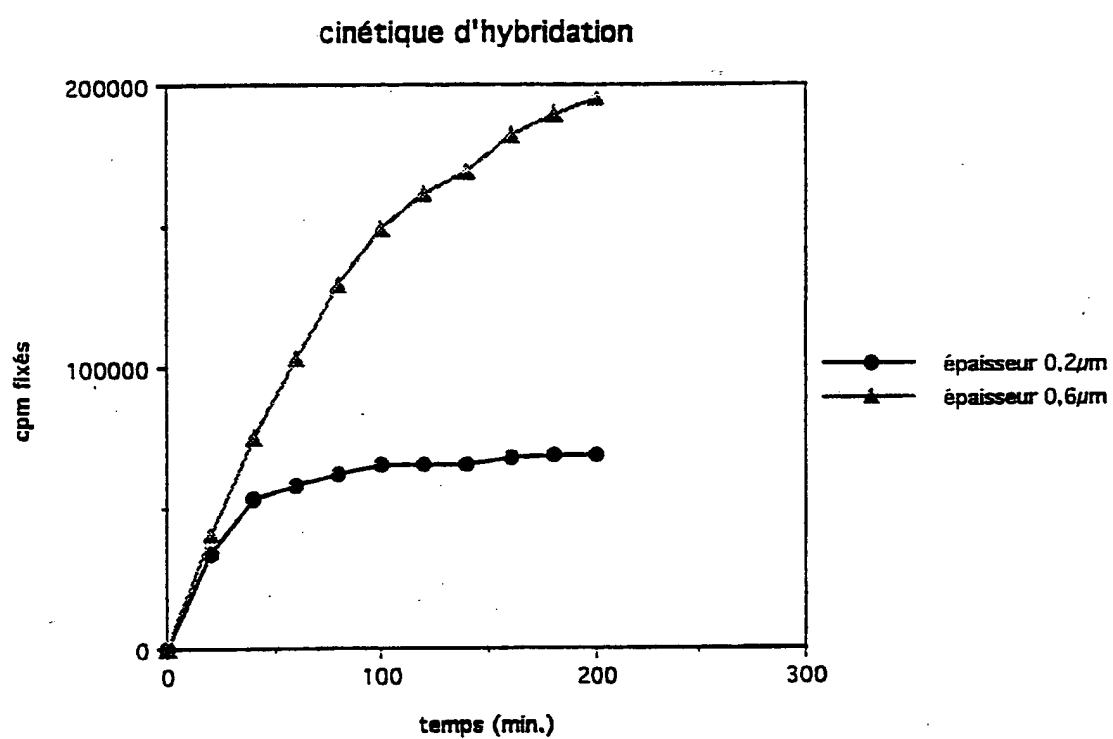


FIGURE 4

courbe de dénaturation

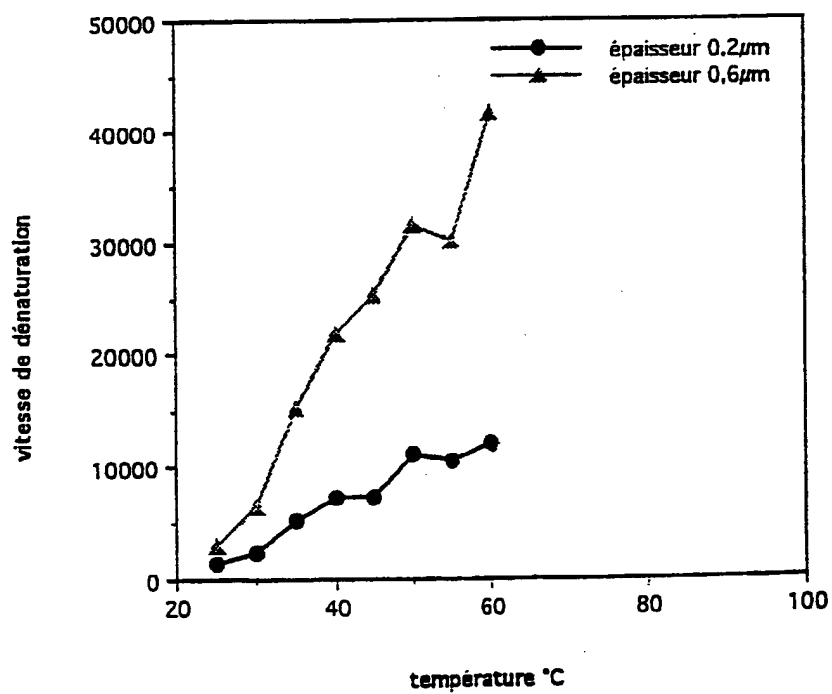
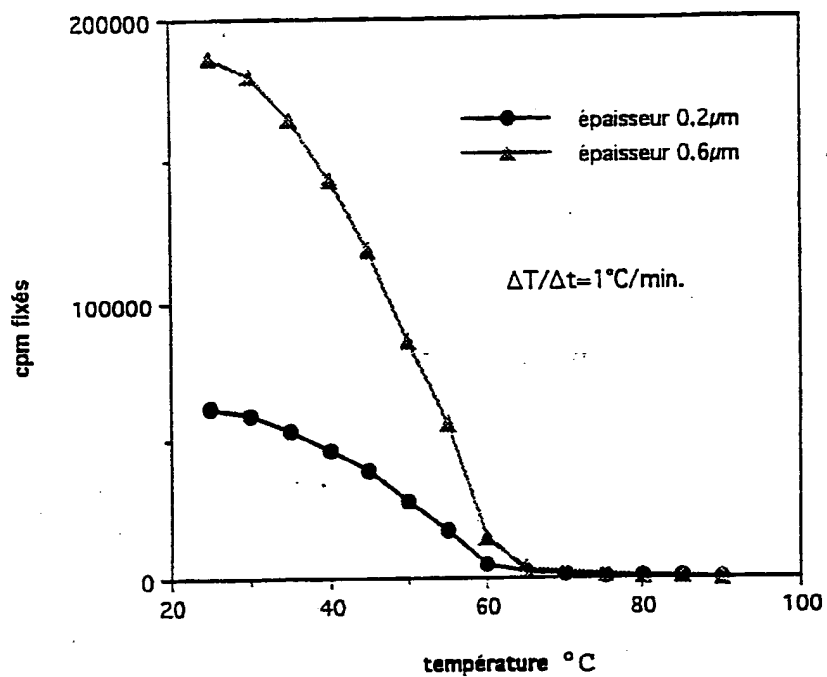


FIGURE 5

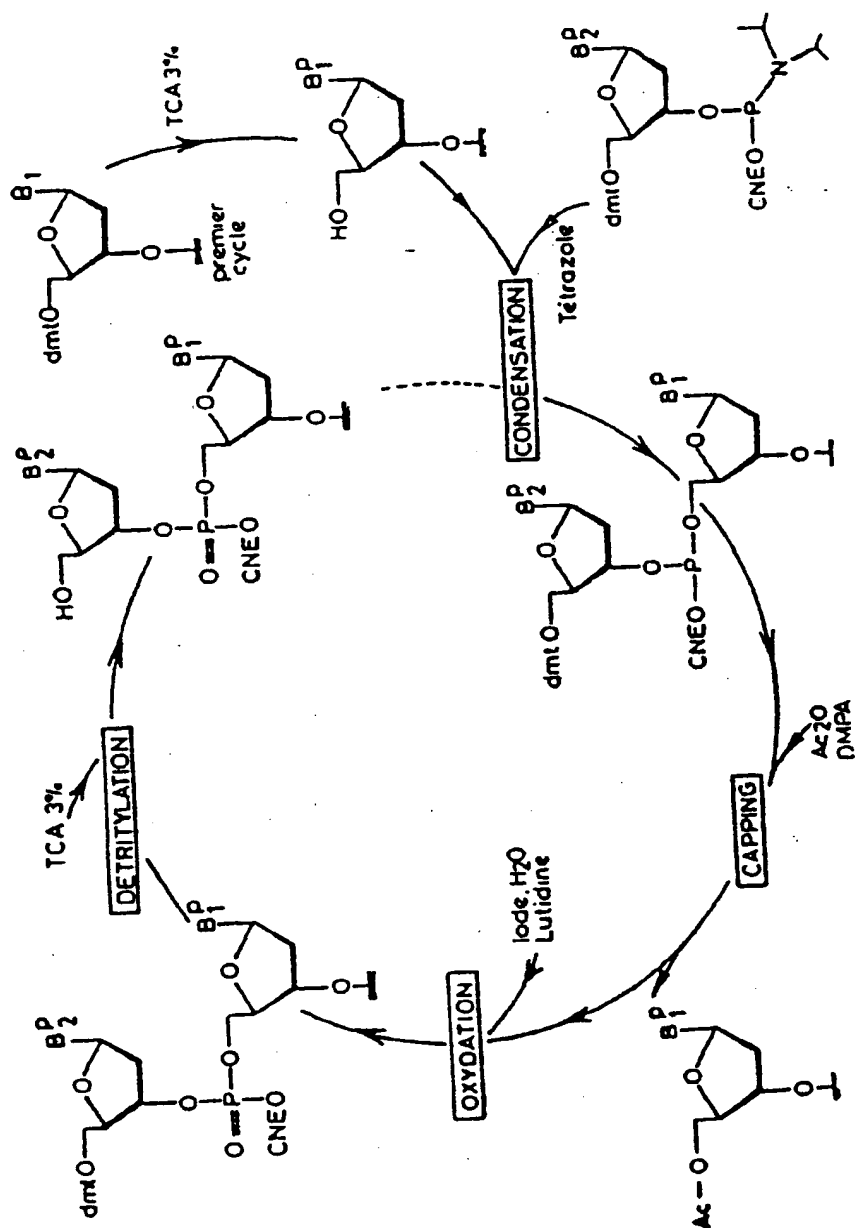
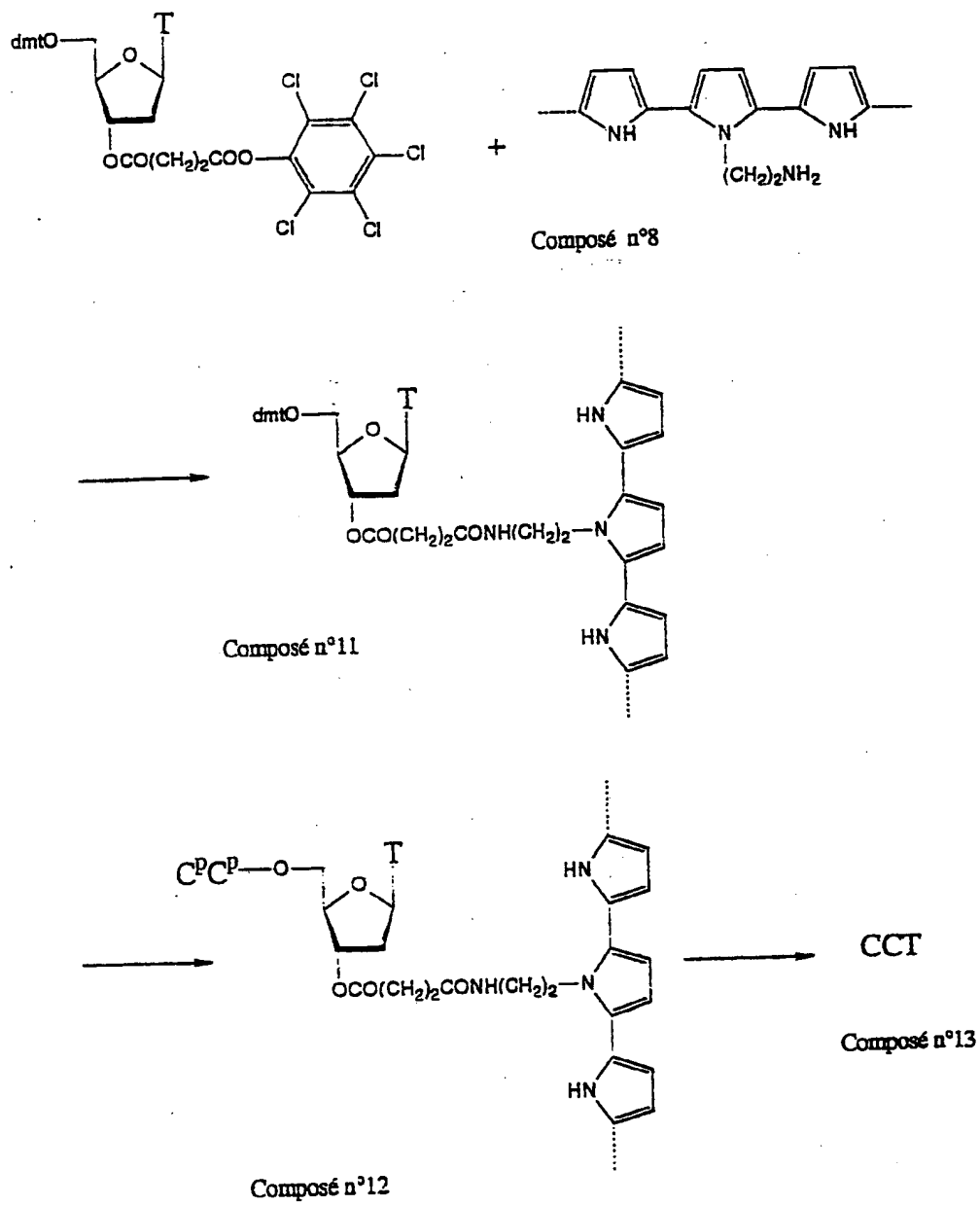
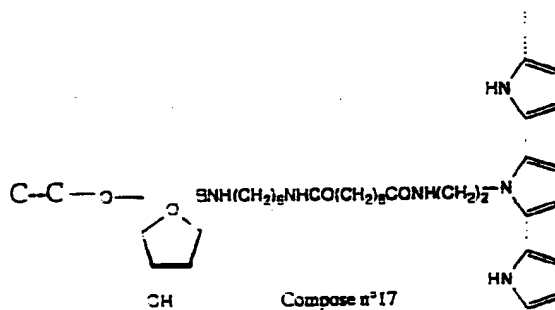
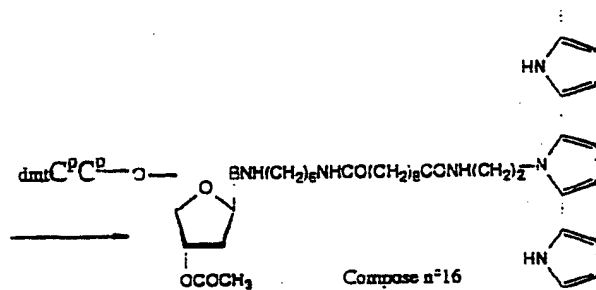
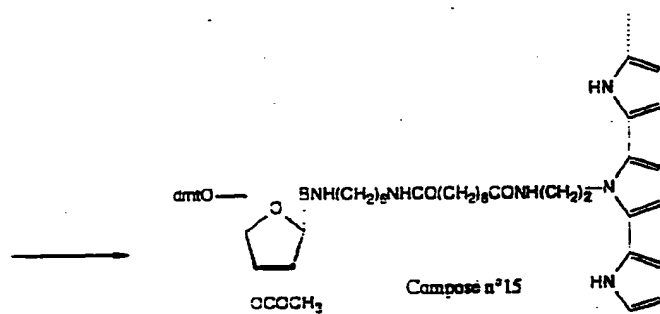
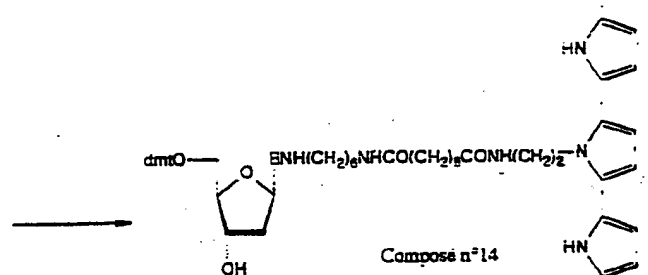
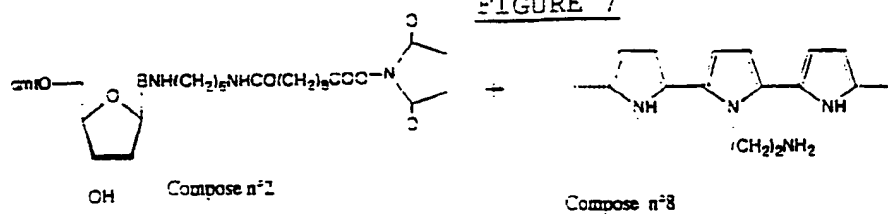


FIGURE 6



7/8

FIGURE 7



8/8

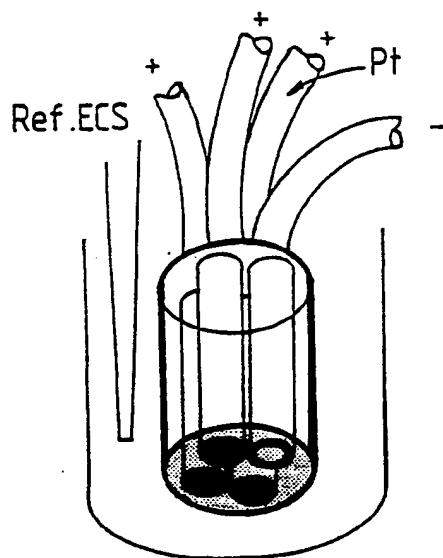


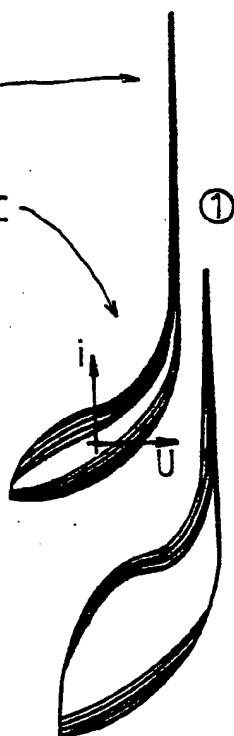
FIGURE 8

3 electrodes de travail (+) 0,3 mm
 1 contre-electrode integree (-) 0,3 mm
 1 electrode de ref.
 Volume reactionnel: 0,3 ml

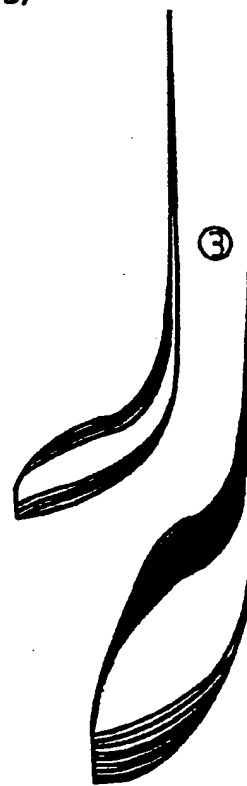
8a)

* charge faible
 de $2 \text{ à } 4 \cdot 10^{-4} \text{ C}$

* charge forte
 de $1 \text{ à } 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ C}$



8b)



REPUBLIQUE FRANÇAISE

PRELIMINAIRE

2703359

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 483484
FR 9303732

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 314 009 (MILES INC.) * page 2 - page 4 * ----	1
A	WO-A-91 08307 (MICROPROBE CORPORATION) * abrégé; revendications * ----	13, 15
A	WO-A-92 07882 (GENTA INCORPORATED) * revendications; figures * -----	13, 14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07H C12Q C08G
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
25 Janvier 1994		DAY, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 1503 01.82 (P04C12)